

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

19



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



11 Veröffentlichungsnummer: **0 495 204 A1**

12

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: **91121326.2**

51 Int. Cl.5: **C07D 475/04, A61K 31/495**

22 Anmeldetag: **12.12.91**

30 Priorität: **16.01.91 CH 108/91**

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**22.07.92 Patentblatt 92/30**

84 Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE**

71 Anmelder: **EPROVA Aktiengesellschaft**  
**Im Laternenacker 5**  
**CH-8200 Schaffhausen(CH)**

72 Erfinder: **Müller, Hans Rudolf**  
**Beckenwäldli 18**  
**CH-8207 Schaffhausen(CH)**  
Erfinder: **Ulmann, Martin**  
**Steigstrasse 36**  
**CH-8447 Dachsen(CH)**  
Erfinder: **Conti, Josef**  
**Winkelriedstrasse 22**  
**CH-8203 Schaffhausen(CH)**  
Erfinder: **Mürdel, Günter**  
**vor Hegin**  
**W-7708 Tengen-Büsslingen(DE)**

54 Verfahren zur Herstellung von (6S)- und (6R)-Tetrahydrofolsäure.

57 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von (6S)- und (6R)-Tetrahydrofolsäure und deren Additionssalze mit einer Sulfonsäure oder mit Schwefelsäure, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass man (6R,S)-Tetrahydrofolsäure mit einer Sulfonsäure oder mit Schwefelsäure umsetzt, erhaltenes Säureadditionssalz fraktioniert kristallisiert und, falls erwünscht, aus den erhaltenen diastereomeren Säureadditionssalzen durch Behandlung mit einer Base die (6S)- oder (6R)-Tetrahydrofolsäure freisetzt und isoliert.

Die Erfindung betrifft ausserdem die neuen Säureadditionssalze von (6S)- und (6R)-Tetrahydrofolsäure mit einer Sulfonsäure oder mit Schwefelsäure, deren Verwendung als Arzneimittel oder Ausgangsmaterial zur Herstellung eines Arzneimittels und deren Verwendung zur Herstellung von optisch aktiven 5-Methyl-, 5-Formyl- und 5,10-Methylen-tetrahydrofolsäuren und deren Salzen mit starken Basen und Säuren.

EP 0 495 204 A1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von N-[4-[[[(2-amino-1,4,5,6,7,8-hexahydro-4-oxo-(6S)-pteridiny]methyl)amino]benzoyl]-L-glutaminsäure (im folgenden (6S)-Tetrahydrofolsäure genannt) und deren Salzen und N-[4-[[[(2-amino-1,4,5,6,7,8-hexahydro-4-oxo-(6R)-pteridiny]methyl)amino]benzoyl]-L-glutaminsäure (im folgenden (6R)-Tetrahydrofolsäure genannt) und deren Salzen.

Tetrahydrofolsäurederivate enthalten 2 asymmetrische Zentren. Dabei liegt aufgrund der Synthese dieser Derivate aus Folsäure, der N-(Pteroyl)-L-glutaminsäure, das im Glutaminsäure-Rest enthaltene optisch aktive C-Atom in der L-Form vor, während das durch Hydrierung der Doppelbindung in 5,6-Stellung des Pteroyl-Restes entstandene optisch aktive C-Atom in Position 6 in der racemischen, der (6R,S)-Form, vorliegt. Synthetische Derivate der Tetrahydrofolsäure bestehen demnach aus einer 1:1 Mischung von 2 Diastereomeren. Im natürlichen Vorkommen, z.B. in der Leber, findet man die Tetrahydrofolate nur in der einen Diastereomeren-Form, wobei 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure in der (6S)-Form vorliegt.

Als Arzneimittel werden Tetrahydrofolate vorwiegend als Calcium-Salz der 5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure (Leucovorin) oder der 5-Methyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure verwendet zur Behandlung von megaloblastischer Folsäure-Anämie, als Antidot zur Verstärkung der Verträglichkeit von Folsäure-Antagonisten, speziell von Aminopterin und Methotrexat in der Krebstherapie ("leucovorin rescue"), zur Verstärkung des therapeutischen Effektes von 5-Fluoruracil und der Behandlung von Autoimmunkrankheiten wie Psoriasis und rheumatischer Arthritis sowie zur Verstärkung der Verträglichkeit von bestimmten Antiparasitika, etwa Trimethoprim-Sulfamethoxazol, in der Chemotherapie.

Tetrahydrofolsäure dient als Grundsubstanz zur Herstellung diverser Tetrahydrofolsäure-Derivate.

Anstrengungen zur Herstellung von (6S)-oder (6R)-Tetrahydrofolsäure haben bisher zu folgenden Methoden geführt:

- enzymatische Methoden
- physikochemische Methoden
- chemische Methoden

Enzymatische Methoden beinhalten eine normalerweise chemisch durchgeführte Reduktion von Folsäure zu 7,8-Dihydrofolsäure und anschliessender enzymatischer Reduktion derselben zu (6S)-5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure z.B. gemäss L. Rees et al. Tetrahedron 42(1), 117-36 (1986) oder EP-A2-0 356 934. Diese Verfahren sind jedoch im chemischen Schritt nur schwer auf der 7,8-Dihydrofolsäure-Stufe zu stoppen und ergeben auch im enzymatischen Schritt typischerweise nur sehr geringe Raum-Zeit-Ausbeuten, benötigen teu-

re-Co-Faktoren wie NADPH und erfordern eine meist komplexe Aufarbeitungsmethodik. Bisher bekannte Methoden der enzymatischen Herstellung von optisch reiner Tetrahydrofolsäure sind zur Herstellung dieser Verbindung im technischen Massstab nicht geeignet.

Die Trennung der Diastereomeren-Paare wurde auch mittels Chromatographie versucht, J. Feeney et al, Biochemistry, 20, 1837, (1981). Diese Methoden sind für die Herstellung der Diastereomeren im technischen Massstab nicht geeignet.

Ebenfalls bekannt ist aus der Gruppe der physikochemischen Verfahren eine asymmetrische Reduktion von Folsäure an chiralen Elektroden, S. Kwee et al, Bioelectrochem. Bioenerg. 7, 693-698, (1980). Aufgrund der während der Reduktion erlaubten Konzentrationen an Folsäure (typischerweise  $10^{-3}$  M) und der nur schwer durchführbaren Abtrennung des asymmetrischen Induktors nach erfolgter Reduktion können diese Reaktionen jedoch nicht zur technischen Herstellung eingesetzt werden.

Aus dem Bereich der chemischen Synthese besteht die Möglichkeit der asymmetrischen Hydrierung von Folsäure in Gegenwart eines optisch aktiven Katalysators, etwa gemäss P.H. Boyle, et al., J. Chem. Soc. Chem. Commun. (1974), 10, 375-6. Diese erfordert aber den Einsatz sehr teurer Katalysatoren, die nach erfolgter homogener Katalyse nur unter grossem Aufwand vom Produkt abzutrennen sind.

Es gibt daher bis heute noch kein technisch brauchbares Verfahren zur Gewinnung von optisch reiner Tetrahydrofolsäure.

Es bestand somit die Aufgabe, eine einfache, technisch brauchbare und wirtschaftliche Methode zur Herstellung von optisch reiner Tetrahydrofolsäure zu erarbeiten.

Es wurde nun überraschend gefunden, dass aus wässrigen Lösungen von (6R,S)-Tetrahydrofolsäure oder deren Salze nach Zusatz von Sulfonsäuren oder Schwefelsäure sich entsprechendes optisch angereichertes Tetrahydrofolsäure-Additionssalz ausscheidet. Dieses lässt sich durch Filtration abtrennen. Aus dem Filtrat lässt sich das diastereomere Additionssalz isolieren. Beide Salze können anschliessend durch Umkristallisation und/oder Freisetzung der Tetrahydrofolsäure und nachfolgender Versalzung sowohl chemisch wie auch optisch gereinigt werden. Dass bei der Kristallisation des Sulfonsäure- bzw. Schwefelsäure-Additionssalzes eine optische Auftrennung stattfindet, ist um so mehr überraschender, als dass sich durch Herstellung/Umkristallisation anderer Salze, z.B. des Chlorwasserstoffsäure-Additionssalzes, keine optische Anreicherung feststellen lässt (W. Frick, et al., Helv. Chim. Acta, 57, 2658-61 (1974)). Auch mit andern starken Säuren wie Bromwasser-

stoffsäure, Iodwasserstoffsäure, Salpetersäure, Phosphorsäure, Ameisensäure, Oxalsäure, Chlor-, Dichlor- und Trichloressigsäure liess sich keine Anreicherung einer der epimeren Formen der Tetrahydrofolsäure erzielen.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von (6S)- und (6R)-Tetrahydrofolsäure sowie von deren Additionssalzen mit Sulfonsäuren oder mit Schwefelsäure, dadurch gekennzeichnet, dass man (6R,S)-Tetrahydrofolsäure mit einer Sulfonsäure oder mit Schwefelsäure umsetzt, erhaltenes Säureadditionssalz fraktioniert kristallisiert und, falls erwünscht, aus den erhaltenen diastereomeren Säureadditionssalzen durch Behandlung mit einer Base die (6S)- und/oder (6R)-Tetrahydrofolsäure freisetzt und isoliert.

Die dabei verwendete (6R,S)-Tetrahydrofolsäure kann sowohl als isoliertes Produkt oder aber auch vorzugsweise als Produkt einer Reduktion von Folsäure direkt in situ eingesetzt werden.

Für das erfindungsgemässe Verfahren geeignete Sulfonsäuren sind aromatische Sulfonsäuren mit 6 bis 14 C-Atomen, araliphatische Sulfonsäuren mit 7 bis 9 C-Atomen oder aliphatische Sulfonsäuren mit 1 bis 3 C-Atomen.

Als aromatische Sulfonsäuren kommen vorwiegend in Betracht Benzolsulfonsäure, Toluolsulfonsäuren, Xylolsulfonsäuren, Nitrobenzolsulfonsäuren, Chlorbenzolsulfonsäuren, Nitrotoluolsulfonsäuren, Naphthalinsulfonsäuren, substituierte Naphthalinsulfonsäuren, Naphthalindisulfonsäuren, Camphersulfonsäuren, Benzimidazolsulfonsäuren, substituierte Benzimidazolsulfonsäuren, wie z.B. 2-Phenylbenzimidazol-5-sulfonsäure und viele andere mehr.

Als araliphatische Sulfonsäure kommt vorwiegend Phenylmethansulfonsäure, als aliphatische Sulfonsäuren vorwiegend Methansulfonsäure und Ethansulfonsäure in Betracht.

Bevorzugte Additionssalze für das erfindungsgemässe Verfahren sind das Benzolsulfonsäure-, ein Toluolsulfonsäure- sowie das Schwefelsäure-Additionssalz.

Die Kristallisation wird aus einem polaren Medium durchgeführt. Dabei eignet sich vor allem Wasser oder ein Gemisch aus Wasser und niedrigen aliphatischen wasserlöslichen Carbonsäuren, insbesondere Essigsäure sowie Milchsäure oder flüssigen wasserlöslichen Amiden wie Formamid, Dimethylformamid, Dimethylacetamid, 1-Methylpyrrolidon, 2-Piperidinon. Das Gemisch enthält üblicherweise mindestens 50% Wasser. Der Einsatz einer solchen Mischung erhöht normalerweise die optische Reinheit der Produkte, wobei jedoch die Ausbeute sinken kann. Abhängig vom angestrebten Ziel und dem jeweiligen Ausgangsmaterial kann das Optimum der Reaktionsbedingungen durch systematische Versuche ohne Schwierigkeiten be-

stimmt werden.

Aufgrund der Oxidationsempfindlichkeit der Tetrahydrofolsäure empfiehlt sich die Verwendung eines Oxidationsschutzmittels wie 2-Mercaptoethanol.

Bei der Kristallisation fällt in der Regel zuerst das Säureadditionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure aus - die diastereomere (6R)-Verbindung reichert sich in den Filtraten an.

Aus den erhaltenen Salzen kann die optisch angereicherte Tetrahydrofolsäure sehr einfach durch Zusatz einer Base wieder freigesetzt werden.

Als weitere chemische wie auch optische Reinigungsmöglichkeit bietet sich die Umkristallisation der (6S)-bzw. (6R)-Tetrahydrofolsäure-Säureadditionssalze und/oder die anschliessend an die Freisetzung der Tetrahydrofolsäure erneut durchgeführte Versalzung mit einer Sulfonsäure und/oder Schwefelsäure an.

Durch dieses Verfahren sind die (6S)- und (6R)-Tetrahydrofolsäure und deren Salze mit starken Basen oder Säuren sehr einfach und besonders wirtschaftlich zugänglich geworden.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der verfahrensgemäss erhaltenen (6S)- und (6R)-Tetrahydrofolsäure und deren Additionssalze mit Sulfonsäuren oder mit Schwefelsäuren zur Herstellung von optisch reinen 5,10-Methylentetrahydrofolsäuren und deren Salze mit starken Basen oder Säuren durch Behandlung mit Formaldehyd. Dabei ist zu beachten, dass aus (6S)-Tetrahydrofolsäure durch Umsetzung mit Formaldehyd 5,10-Methylen-(6R)-tetrahydrofolsäure und aus (6R)-Tetrahydrofolsäure analog 5,10-Methylen-(6S)-tetrahydrofolsäure erhalten wird.

#### Beispiele zur Illustrierung der Erfindung:

Zur Gehaltsbestimmung der Tetrahydrofolsäure, 5-Formyl-, 5-Methyl- und 5,10-Methylentetrahydrofolsäure wurde die folgende HPLC-Methode eingesetzt:

Fliessmittel A:

0.03 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 0.03 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in Wasser

Fliessmittel B:

1 Teil (0.03 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 0.03 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in Wasser)

3 Teile Methanol

danach mit Phosphorsäure auf pH 7.8 gestellt  
Gradient:

innerhalb von 25 Minuten von 2% Fliessmittel B auf 95% Fliessmittel B

Säule:

ODS (Hypersil)

Detektion:

UV-300 nm

Zur Bestimmung des (6S)-Anteils der Tetrahydrofolsäure wurde die folgende HPLC-Methode eingesetzt:

Derivatisierung:

Tetrahydrofolsäure bzw. Additionssalz in Acetonitril/Wasser 1:1 lösen und mit 2,3,4,6-Tetra-o-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosylisothiocyanat umsetzen

Fliessmittel:

2,5 Teile Acetonitril

1,5 Teile Methanol

6,0 Teile Citronensäure 0,02 M

Säule:

RP-8 (Lichrospher)

Detektion:

UV-270 nm

Beispiel 1

14,3 g Toluol-4-sulfonsäure (150 Mol%) werden bei 60°C unter Stickstoff in 440 ml Wasser, enthaltend 0,1% 2-Mercaptoethanol, gelöst. Innerhalb von 5 Minuten werden 25,0 g reine (6R,S)-Tetrahydrofolsäure eingetragen. Die entstandene Suspension wird auf 40°C abgekühlt. Nach 2 - 5 Stunden wird das ausgeschiedene Produkt abfiltriert, mit Wasser und danach mit Ethanol gewaschen.

Man erhält 16,9 g Toluol-4-sulfonsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure mit einem (6S)-Anteil von 86,7%; bestimmt mittels HPLC.

Durch Umkristallisation des erhaltenen Produktes aus einer Mischung von 110 ml N,N'-Dimethylformamid und 220 ml Wasser erhält man Toluol-4-sulfonsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure mit einem (6S)-Anteil von 97,5%; bestimmt mittels HPLC.

$$[\alpha]_D^{25} = -60,6^\circ \quad (c = 0,5\% \text{ in DMF})$$

Zur Freisetzung der (6S)-Tetrahydrofolsäure werden 170 ml Wasser, enthaltend 0,1% 2-Mercaptoethanol, unter Stickstoff auf 10°C abgekühlt. 5,0 g Toluol-4-sulfonsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure werden eingestreut. Zu dieser Suspension werden 4 ml 2n Natronlauge zuge tropft. Nach Abkühlen auf 2°C wird das ausgeschiedene Produkt abfiltriert, mit Wasser und danach mit Ethanol gewaschen.

Man erhält 3,7 g (6S)-Tetrahydrofolsäure mit einem (6S)-Anteil von 97,7%; bestimmt mittels HPLC.

$$[\alpha]_D^{25} = -44,5^\circ \quad (c = 1\% \text{ in Wasser})$$

Beispiel-2

13 g Toluol-4-sulfonsäure (135 Mol%) werden bei 20°C unter Stickstoff in 200 ml Essigsäure und 200 ml Wasser, enthaltend 0,2% 2-Mercaptoethanol, gelöst. 25,0 g reine (6R,S)-Tetrahydrofolsäure werden rasch eingetragen. Die Lösung wird mit wenig authentischem (6S)-Tetrahydrofolsäure-toluol-4-sulfonsäure-Additionssalz angeimpft. Nach 5 Stunden wird das ausgeschiedene Produkt abfiltriert, mit Essigsäure/Wasser und danach mit Ethanol gewaschen.

Man erhält 12,7 g Toluol-4-sulfonsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure mit einem (6S)-Anteil von 93,6%; bestimmt mittels HPLC.

10,0 g des so erhaltenen (6S)-Tetrahydrofolsäure-toluol-4-sulfonsäure-Additionssalzes werden bei 25°C unter Stickstoff in 100 ml Wasser suspendiert und mit Natronlauge 30% auf pH > 3,5 gestellt. Der pH der so erhaltenen Lösung wird danach wieder mit Salzsäure 37% auf unter 1 gebracht. Nach 12 Stunden wird das ausgeschiedene Produkt abfiltriert, mit Wasser und danach mit Ethanol gewaschen.

Man erhält 8,9 g Toluol-4-sulfonsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure mit einem (6S)-Anteil von 99,7%; bestimmt mittels HPLC.

$$[\alpha]_D^{25} = -62,0^\circ \quad (c = 0,5\% \text{ in DMF})$$

Beispiel 3

14,30 g Toluol-4-sulfonsäure (150 Mol%) werden bei 27°C unter Stickstoff in 220 ml L(+)-Milchsäure und 220 ml Wasser, enthaltend 0,2% Mercaptoethanol, gelöst. 25,0 g reine (6R,S)-Tetrahydrofolsäure werden rasch zugegeben. Die entstandene Lösung wird mit wenig authentischem (6S)-Tetrahydrofolsäure-toluol-4-sulfonsäure-Additionssalz angeimpft und auf 20°C gekühlt. Nach 15 - 20 Stunden wird das ausgeschiedene Produkt abfiltriert, mit Milchsäure/Wasser und danach mit Ethanol gewaschen.

Man erhält 15,1 g Toluol-4-sulfonsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure mit einem (6S)-Anteil von 92,5%; bestimmt mittels HPLC.

Beispiel 4

14,3 g Toluol-4-sulfonsäure (150 Mol%) werden bei 27°C unter Stickstoff in 110 ml 1-Methyl-2-pyrrolidon und 110 ml Wasser, enthaltend 0,4% 2-Mercaptoethanol, gelöst. 25,0g reine (6R,S)-Tetrahydrofolsäure werden rasch zugegeben. Die Lösung wird mit 220 ml Wasser verdünnt und auf

20 °C abgekühlt. Nach 15 - 20 Stunden wird das ausgeschiedene Produkt abfiltriert, mit 1-Methyl-2-pyrrolidon/Wasser und danach mit Ethanol gewaschen.

Man erhält 13,3 g Toluol-4-sulfonsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure mit einem (6S)-Anteil von 94,7%; bestimmt mittels HPLC.

#### Beispiel 5

11,5 g Toluol-4-sulfonsäure (150 Mol%) werden bei 27 °C unter Stickstoff in 90 ml N,N'-Dimethylformamid und 90 ml Wasser, enthaltend 0,4% 2-Mercaptoethanol, gelöst. 20 g reine (6R,S)-Tetrahydrofolsäure werden rasch zugegeben. Die Lösung wird mit 180 ml Wasser verdünnt und auf 20 °C abgekühlt. Nach 15 - 20 Stunden wird das ausgeschiedene Produkt abfiltriert, mit N,N'-Dimethylformamid/Wasser und danach mit Ethanol gewaschen.

Man erhält 11,3 g Toluol-4-sulfonsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure mit einem (6S)-Anteil von 91,4%; bestimmt mittels HPLC.

#### Beispiel 6

11,5 g Toluol-4-sulfonsäure (150 Mol%) werden bei 27 °C unter Stickstoff in 100 ml N,N'-Dimethylacetamid und 80 ml Wasser, enthaltend 0,4% 2-Mercaptoethanol, gelöst. 20 g reine (6R,S)-Tetrahydrofolsäure werden rasch zugegeben. Die Lösung wird mit 160 ml Wasser verdünnt und auf 20 °C abgekühlt. Nach 15 - 20 Stunden wird das ausgeschiedene Produkt abfiltriert, mit N,N'-Dimethylacetamid/Wasser und danach mit Ethanol gewaschen.

Man erhält 11,0 g Toluol-4-sulfonsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure mit einem (6S)-Anteil von 91,5%; bestimmt mittels HPLC.

#### Beispiel 7

12 g Benzolsulfonsäure (150 Mol%) werden bei 70 °C unter Stickstoff in 440 ml Wasser, enthaltend 0,1% 2-Mercaptoethanol, gelöst. Innerhalb von 5 Minuten werden 25,0 g reine (6R,S)-Tetrahydrofolsäure eingetragen. Die entstandene Suspension wird auf 60 °C abgekühlt. Nach 2 - 5 Stunden wird das ausgeschiedene Produkt abfiltriert, mit Wasser und danach mit Ethanol gewaschen.

Man erhält 13,8 g Benzolsulfonsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure mit einem (6S)-Anteil von 92,4%; bestimmt mittels HPLC.

10,0 g des so erhaltenen (6S)-Tetrahydrofolsäurebenzolsulfonsäure-Additionssalzes werden bei 25 °C unter Stickstoff in 100 ml Wasser suspendiert und mit Natronlauge 30% auf pH > 3,5 gestellt. Der pH der so erhalte-

nen Lösung wird danach wieder mit Salzsäure 37% auf unter 1 gebracht. Nach 12 Stunden wird das ausgeschiedene Produkt abfiltriert, mit Wasser und danach mit Ethanol gewaschen.

Man erhält 9,0 g Benzolsulfonsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure mit einem (6S)-Anteil von 99,8%; bestimmt mittels HPLC.

$$[\alpha]_D^{25} = -63,5^\circ \quad (c = 1\% \text{ in DMF})$$

Bei dem Ersatz der eingesetzten 150 Mol% Benzolsulfonsäure durch 55 Mol% Benzolsulfonsäure und 50 Mol% Salzsäure erhält man unter gleichen Kristallisationsbedingungen 12,7 g Benzolsulfonsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure mit einem (6S)-Anteil von 91,6%; bestimmt mittels HPLC.

Zur Freisetzung der (6R)-Tetrahydrofolsäure wird das Filtrat mit Natronlauge auf pH 3,5 gestellt. Nach Abkühlen auf 5 °C wird das ausgeschiedene Produkt abfiltriert, mit Wasser und danach mit Ethanol gewaschen.

10 g des so erhaltenen Rückstandes werden in 150 ml Wasser, enthaltend 0,1% 2-Mercaptoethanol, und 39 ml 2N Schwefelsäure bei 50 °C unter Stickstoff gelöst. Nach langsamem Abkühlen über 15 Stunden auf 20 °C und anschliessendem 12-stündigem Stehenlassen wird das ausgeschiedene Produkt abfiltriert, mit Wasser und danach mit Ethanol gewaschen.

Man erhält 9,7 g Schwefelsäure-Additionssalz der (6R)-Tetrahydrofolsäure mit einem (6R)-Anteil von 97,7%; bestimmt mittels HPLC.

#### Beispiel 8

30 ml 2 M Schwefelsäure werden bei 60 °C mit 130 ml Wasser, enthaltend 0,2% 2-Mercaptoethanol, und 164 ml Eisessig vorgelegt. Innerhalb von 5 Minuten werden 20 g reine (6R,S)-Tetrahydrofolsäure eingetragen. Die entstandene Lösung wird auf 50 °C abgekühlt. Nach 1 Stunde wird das ausgeschiedene Produkt abfiltriert, mit Wasser/Eisessig und danach mit Ethanol gewaschen.

Man erhält 11,0 g Schwefelsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure mit einem (6S)-Anteil von 65,5%; bestimmt mittels HPLC.

Durch zweifaches Umkristallisieren von 10 g Schwefelsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure aus Dimethylformamid/Wasser 1:3 erhält man 3,9 g Schwefelsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure mit einem (6S)-Anteil von 94,3%; bestimmt mittels HPLC.

#### Beispiel 9

Nach-in-der-Literatur-beschriebenen-Verfahren, z.B. R.L. Blakley et al, Folates and Pterins, 1, 93-104 (1984) in situ hergestellte (6R,S)-Tetrahydrofolsäure wird direkt weiter mit Toluol-4-sulfonsäure umgesetzt:

50 g Folsäure werden etwa nach C. Temple, J. Med. Chem., 22, 731 (1979) bei 25 °C unter Stickstoff in 200 ml Wasser suspendiert. Mit ca. 40 g Natronlauge 30% wird der pH der Lösung auf 12 gestellt. Nach Zugabe von 25 g Natriumborhydrid (630 Mol%) in 110 ml Wasser wird das Reaktionsgemisch auf 70-75 °C aufgeheizt und während 90 Minuten bei dieser Temperatur gehalten. In die so erhaltene Lösung von (6R,S)-Tetrahydrofolsäure-Natriumsalz werden nach Abkühlen auf 25 °C 30 g Toluol-4-sulfonsäure (150 Mol%), gelöst in 200 ml Eisessig, zugetropft. Mit 96 g Salzsäure 37 % wird danach der pH der Lösung auf unter 1 gestellt. Nach 12 Stunden wird das ausgeschiedene Produkt abfiltriert, mit Essigsäure/Wasser und danach mit Ethanol gewaschen.

Man erhält 32,9 g Toluol-4-sulfonsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure mit einem Gehalt von 82% und einem (6S)-Anteil von 95,4%; bestimmt mittels HPLC.

3,0 g des so erhaltenen (6S)-Tetrahydrofolsäuretoluol-4-sulfonsäure-Additionssalzes werden bei 25 °C unter Stickstoff in 30 ml Wasser suspendiert und mit ca. 3 g Natronlauge 30% auf pH 11,6 gestellt. Zur so erhaltenen Lösung werden 0,9 g Toluol-4-sulfonsäure (120 Mol%), gelöst in 36 ml Eisessig, zugetropft. Mit 2,2 g Salzsäure 37% wird danach der pH der Lösung auf unter 1 gestellt. Nach 12 Stunden wird das ausgeschiedene Produkt abfiltriert, mit Essigsäure/Wasser und danach mit Ethanol gewaschen.

Man erhält 1,81 g Toluol-4-sulfonsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure mit einem Gehalt von 100% und einem 6S-Anteil von 98,9%; bestimmt mittels HPLC.

#### Beispiel 10

Durch den Ersatz der Toluol-4-sulfonsäure in Beispiel 9 durch die äquivalente Menge an Benzolsulfonsäure lässt sich in ähnlicher Weise auch das Benzolsulfonsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure herstellen.

Man erhält 32,2 g Benzolsulfonsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure mit einem Gehalt von 80% und einem (6S)-Anteil von 94,2%; bestimmt mittels HPLC.

#### Beispiel 11

Durch den Ersatz der Toluol-4-sulfonsäure in Beispiel 9 durch die äquivalente Menge an

Schwefelsäure lässt sich in ähnlicher Weise auch das Sulfat der (6S)-Tetrahydrofolsäure herstellen.

Man erhält 27,1 g (6S)-Tetrahydrofolsäuresulfat mit einem Gehalt von 85% und einem (6S)-Anteil von 69,2%; bestimmt mittels HPLC.

#### Beispiele 12 - 18

In ähnlicher Weise, wie in den Beispielen 1 - 8 beschrieben, lassen sich herstellen:

12. Methansulfonsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure.

13. Ethansulfonsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure.

14. Phenylmethansulfonsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure.

15. Campher-10-sulfonsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure.

16. Naphthalin-1-sulfonsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure.

17. Naphthalin-2-sulfonsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure.

18. Naphthalin-1,5-disulfonsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure.

#### Beispiel 19

50 g von nach Beispiel 8 erhaltenem Schwefelsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure werden bei 20 °C unter Stickstoff in 500 ml Wasser mit 200 ml Natronlauge 2N gelöst. Nach der Zugabe von 7,5 ml Formaldehyd 36% (125 Mol%) wird die Lösung mit einer Mischung von 275 ml Eisessig und 275 ml Schwefelsäure 2 N versetzt. Nach dem Kühlen auf 2 °C wird das ausgeschiedene Produkt abfiltriert und mit Ethanol überwaschen.

Man erhält 39,6 g 5,10-Methylen-(6R)-tetrahydrofolsäure mit einem Gehalt von 98,6% und einem (6R)-Anteil von 99,6%; bestimmt mittels HPLC.

#### Beispiel 20

28 g von nach Beispiel 10 erhaltenem Benzolsulfonsäure-Additionssalz der (6S)-Tetrahydrofolsäure werden bei ca. 25 °C unter Stickstoff in 130 ml Wasser mit Natronlauge 30% gelöst. Nach der Zugabe von 44 ml Ameisensäure 36% wird die Lösung geteilt und die eine Hälfte mit 3 g NaBH<sub>4</sub> versetzt. Nach 12 Stunden wird durch Zugabe von 10 ml Salzsäure 37% angesäuert. Das ausgeschiedene Produkt wird abfiltriert und mit Wasser und Ethanol überwaschen.

Man erhält 11 g 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure mit einem Gehalt von 95,8% und einem (6S)-Anteil von 99,5%; bestimmt mittels HPLC.

Die andere Hälfte wird mit überschüssigem



Calciumchlorid versetzt, das sich ausscheidende Produkt wird abfiltriert und mit Wasser und Ethanol überwaschen.

Man erhält 14 g 5-Formyl-(6S)-Tetrahydrofolsäure-Calcium-Salz mit einem Gehalt von 96,2% und einem (6S)-Anteil von 99,7%; bestimmt mittels HPLC.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von (6S)- und (6R)-Tetrahydrofolsäure sowie von deren Additionssalzen mit Sulfonsäuren oder mit Schwefelsäure, dadurch gekennzeichnet, dass man (6R,S)-Tetrahydrofolsäure mit einer Sulfonsäure oder mit Schwefelsäure umsetzt, erhaltenes Säureadditionssalz fraktioniert kristallisiert und, falls erwünscht, aus den erhaltenen diastereomeren Säureadditionssalzen durch Behandlung mit einer Base die (6S)- und/oder (6R)-Tetrahydrofolsäure freisetzt und isoliert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Kristallisation aus einem polaren Medium, vorzugsweise aus Wasser oder einem Gemisch aus Wasser, mit einer niedrigen, aliphatischen, wasserlöslichen Carbon-säure, insbesondere mit Essigsäure, Milchsäure oder einem Gemisch aus Wasser mit einem flüssigen wasserlöslichen Amid, insbesondere mit Methylpyrrolidon, Formamid, Dimethylformamid oder Dimethylacetamid durchgeführt wird.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man als Sulfonsäure eine aromatische Sulfonsäure mit 6 bis 14 C-Atomen, eine araliphatische Sulfonsäure mit 7 bis 9 C-Atomen oder eine aliphatische Sulfonsäure mit 1 bis 3 C-Atomen verwendet.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass man als Additionssalz das Benzolsulfonsäure-, Toluol-4-sulfonsäure- oder das Schwefelsäure-Additionssalz verwendet.
5. (6S)-Tetrahydrofolsäure-benzolsulfonat und (6R)-Tetrahydrofolsäure-benzolsulfonat.
6. (6S)-Tetrahydrofolsäure-toluol-4-sulfonat und (6R)-Tetrahydrofolsäure-toluol-4-sulfonat.
7. (6S)-Tetrahydrofolsäure-sulfat und (6R)-Tetrahydrofolsäuresulfat.
8. Methansulfonsäure-, Ethansulfonsäure-, Phenylmethansulfonsäure-, Campher-10-

sulfonsäure-, Naphthalin-1-sulfonsäure-, Naphthalin-2-sulfonsäure-, Naphthalin-1,5-disulfonsäure-Additionssalze der (6S)-Tetrahydrofolsäure.

9. Verwendung von (6S)- oder (6R)-Tetrahydrofolsäure oder von deren Additionssalzen mit einer Sulfonsäure oder mit Schwefelsäure, hergestellt nach einem der Ansprüche 1, 2, 3 oder 4, als Ausgangsmaterial zur Herstellung von optisch reiner 5,10-Methylen-tetrahydrofolsäure, 5-Methyltetrahydrofolsäure oder 5-Formyltetrahydrofolsäure und deren Salzen mit starken Basen oder Säuren.
10. Verwendung von Salzen der (6S)- oder (6R)-Tetrahydrofolsäure mit Schwefelsäure oder einer Sulfonsäure als Bestandteil eines Arzneimittels oder als Ausgangsmaterial zur Herstellung eines Arzneimittels.



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 91 12 1326

## EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE

Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
X	EP-A-0 348 641 (EPROVA AG) * Ansprüche *	1,9	C07D475/04 A61K31/495
A	EP-A-0 266 042 (UNIVERSITY OF STRATHCLYDE) * Beispiele *	1,9	
A,D	JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, Bd. 22, Nr. 6, Juni 1979, WASHINGTON US Seiten 731 - 734; C. TEMPLE, JR., ET AL.: 'Preparation and Purification of ...'	1,9	
A,D	EP-A-0 356 934 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) * Anspruch 1 *	1	
A	EP-A-0 367 902 (EPROVA AG) * Ansprüche *	1	
A	EP-A-0 293 029 (EPROVA AG) * Ansprüche *	1	
A,D	TETRAHEDRON, Bd. 42, Nr. 1, 1986, OXFORD GB Seiten 117 - 136; L. REES ET AL.: 'Asymmetric reduction of dihydrofolate ...'	1	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			C07D
Recherchenort BERLIN	Abschlußdatum der Recherche 08 APRIL 1992	Prüfer CHRISTIAN HASS	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument A : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund L : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			

EPO FORM 1503 (03.92) (P0400)